

新型合生元酸奶的研制

彭刘杨, 曾小群*, 潘 晴, 王 刚, 何亚婷, 潘道东, 陆 茵, 陈群渊

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为制备新型合生元酸奶, 研究了益生元的种类及添加量、益生菌混合比例、总接种量及发酵时间、发酵温度对合生元酸奶活菌数和品质的影响。结果表明: 原料乳中低聚木糖、低聚果糖、低聚异麦芽糖添加量分别为 0.8%、0.6%、0.8%(w/v), 以体积比为 1:1 的干酪乳杆菌 S1 和乳酸乳球菌 LB12 菌液为发酵剂, 总接种量为 3%(v/v), 37 °C 恒温发酵 10 h, 在此条件下制备的酸奶甜中带酸, 质地均匀, 色泽为乳白色, 香味浓郁, 活菌数达 9.26×10^9 cfu·mL⁻¹, 为市售伊利原味酸奶 15 倍。该新型合生元酸奶具有潜在的降胆固醇和抗氧化功能, 具有良好的市场前景和发展空间。

关键词: 益生元; 益生菌; 活菌数; 加工工艺; 合生元酸奶

中图分类号: TS252.42

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2016) 04-0033-05

合生元又称合生素或共生元, 是益生元和益生菌的混合制剂, 能促进乳制品中钙镁等矿物质和维生素的吸收, 增强乳制品中食物纤维的排毒作用, 并具有降低血压及血脂等作用。Fuller 将益生菌定义为一种活的微生物制剂, 它通过改善肠道微生物菌群的平衡而发挥保健功能^[1]。益生元是一种膳食补充剂, 能促进益生菌增殖, 改善肠道菌群, 其包括低聚糖、蛋白质及其水解物、多糖、多元醇类、植物天然提取物等^[2], 使用最多的为低聚糖。目前市售发酵乳制品主要为普通酸奶, 其中益生菌数目有限、活性较低。酸奶的菌种大多数采用嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌^[3], 种类单一, 功能特性不足。益生元产品也主要局限于口服液制剂和婴儿及老年人配方奶粉中, 所用益生元主要局限为低聚果糖和低聚半乳糖。由于合生元酸奶中益生菌含量高于普通市售酸奶, 其中的益生元还能进一步促进肠道中益生菌增殖, 增加发酵乳制品营养价值和保健功效, 市场潜力巨大。

魏艳等^[4]从新疆传统酸羊奶中分离出干酪乳杆菌 S1, 干酪乳杆菌具有良好的耐酸及胆汁抗性, 能在肠道内大量存活, 调节肠道菌群平衡, 增强宿主对微生物病原体的非特异免疫力, 缓解乳糖不

耐症, 预防癌症和抑制肿瘤生长^[5]。乳酸乳球菌 LB12 分离自泡菜^[6], 该菌能够降低胆固醇^[6-7], 高产胞外多糖^[8], 促进人体消化吸收, 并且具有良好的抗氧化功能^[9]。低聚糖是很好的甜味剂, 具有低热量特点, 可在糖尿病、高血压、肥胖患者的低能量食品中发挥作用。此外, 低聚糖还能增殖酸奶中益生菌和肠道有益菌群, 降低血清胆固醇, 预防结肠癌^[10-11]。

本文利用功能性乳酸菌——干酪乳杆菌 S1、乳酸乳球菌 LB12 和 5 种低聚糖益生元制备合生元酸奶, 以获得高活性乳酸菌的功能性合生元酸奶的制备工艺, 为开发新型合生元酸奶及其产业化提供技术支持和研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株: 干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)S1、乳酸乳球菌 LB12(*Lactococcus lactis*), 本实验室保存。

培养基: MRS 固体培养基及 MRS 液体培养基购于杭州微生物试剂有限公司。

益生元: 低聚异麦芽糖(IMO)、低聚木糖(XOS)、低聚半乳糖(Galactooligosaccharides, GOS)、

收稿日期: 2015-11-10.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(41406165); 国家星火计划项目(2013GA701018, 2014GA701048)。

第一作者: 彭刘杨(1991-), 女, 湖北松滋人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 食品生物技术。E-mail: pliuYang@126.com

*通信作者: 曾小群(1982-), 女, 四川仁寿人, 博士/副教授, 主要研究方向: 畜产品加工。E-mail: zxqun3447@126.com

低聚果糖(FOS)购自上海玉博生物科技有限公司;水苏糖(stachyose)购自上海叶源生物公司。

原料: 伊利高蛋白脱脂高钙奶粉、伊利原味酸奶、白砂糖均为市售。

主要仪器和设备: LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂); JB090312-02 净化工作台(苏州华科净化设备有限公司); HWS 智能型恒温恒湿培养箱(宁波江南仪器厂); KD723 分光光度计(上海科登精密仪器有限公司); pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 混合益生菌比例的确定

将保藏于 -80°C 冰箱中的干酪乳杆菌 S1 和乳酸乳球菌 LB12 活化 3 代后, 按 2%(v/v)接种至复原乳中, 37°C 发酵至凝乳, 再转接 1 次制成生产发酵剂。将干酪乳杆菌 S1 和乳酸乳球菌 LB12 生产发酵剂分别按体积比 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1 的比例, 以 2%的总接种量接种至复原乳中, 在 37°C 恒温发酵 6 h 后取出, 测 pH 值并进行感官评定。感官评定指标为口感、组织状态、色泽、气味, 各指标满分 10 分, 等级为: 10 分(很好), 8 分(良好), 6 分(一般), 4 分(较差), 2 分(极差), 由 8 名评分员进行评定。

1.2.2 益生元组合的选择及添加浓度的确定

按确定的益生菌比例, 将混合益生菌接种到分别添加了 0.6%(w/v)低聚木糖、低聚异麦芽糖、低聚半乳糖、低聚果糖、水苏糖益生元的 MRS 液体培养基中, 37°C 培养 12 h 后测其 600 nm 处的吸光度值。混合益生菌总接种量固定为 2%(v/v), 筛选出对于混合益生菌增殖效果最佳的 3 种益生元。

将上述确定的 3 种益生元分别以 5 种不同的浓度梯度(0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%)加入 MRS 液体培养基中, 然后将确定的益生菌组合以 2%的总接种量分别接种至上述培养基中, 在 37°C 恒温培养 12 h 后, 测 600 nm 处的吸光度。选出各种益生元对于益生菌组合增菌效果最佳的 3 种浓度。根据正交试验表 $L_9(3^4)$ 确定对混合益生菌组合增菌效果最佳的益生元组合。

1.2.3 正交试验优化合生元酸奶发酵条件

干酪乳杆菌最宜生长温度范围为 $35\sim 40^{\circ}\text{C}$ ^[12], 在 $25\sim 37^{\circ}\text{C}$ 范围内, 培养温度越高, 乳酸乳球菌生长越好^[13]。但发酵温度过高, 酸奶的凝胶状态会被

破坏, 会造成乳清大量析出。发酵温度过低也会影响酸奶的凝乳效果, 降低酸奶品质。本实验中将发酵温度分别设为 $36, 37, 38^{\circ}\text{C}$ 。

在制备合生元酸奶的实验过程中发现, 当发酵时间为 6~10 h 时, 酸奶逐渐凝固, 且在此时间段内尚未有大量乳清析出, 所以本实验中将发酵时间分别设为 6, 8, 10 h。发酵时间如果过短, 会导致酸奶结构松散甚至无法凝固; 发酵时间过长, 则会造成乳清大量析出。

实验过程中, 当益生菌接种量过大时, 将会使乳清大量析出而破坏酸奶的风味。所以益生菌接种量不宜过高, 本实验中将菌种总接种量分别设为 2%, 3%和 4%。

选用发酵温度(D)、发酵时间(E)和菌种总接种量(F)为因素, 以酸奶的感官评分作为评价指标, 根据正交实验设计表 $L_9(3^4)$ 进行优化合生元酸奶发酵条件的实验, 因素水平见表 1。

表 1 发酵条件正交试验设计

水平	$D/^{\circ}\text{C}$	E/h	$F/\%$
1	36	6	2
2	37	8	3
3	38	10	4

1.2.4 合生元酸奶高活性验证实验

将复原乳于最佳发酵条件下发酵后, 检测合生元酸奶总活菌数, 并与市售伊利原味酸奶中的活菌数进行比较。

活性验证方法: 将 3M 试纸置于平坦表面处, 将 1 mL 样液垂直滴加在 3M 试纸的中央处。盖上上层膜, 让液体均匀分布于 3M 试纸上, 拿起压板, 静置至少 1 min 使培养基凝固。置 37°C 培养 48 h 观察记录结果^[14]。

1.2.5 数据分析

所有试验均重复 3 次, 每次测 3 个平行样品, 数据采用“平均值 $\pm$ 标准差”来表示。

2 结果与分析

2.1 益生菌比例的确定

由表 2 可知, 干酪乳杆菌 S1 与乳酸乳球菌 LB12 体积比为 1:2 或 1:1 或 2:1 时, 发酵所得的酸奶 pH 值较低且相差不大, 但是发酵乳中添加的干酪乳杆菌 S1 与乳酸乳球菌 LB12 体积比为 1:1 时,

发酵乳的色泽质地和香味明显比其他 2 个样品要好, 稳定性也高. 因此, 选用干酪乳杆菌 S1 与乳酸乳球菌 LB12 之比为 1:1 作为研究合生元增殖效果的最佳比例.

2.2 益生元组合及浓度的确定

2.2.1 益生元组合的确定

对图 1 进行单因素方差分析: 添加不同益生元对益生菌组合增菌效果极显著($P<0.01$), 其中以添加了低聚木糖作为碳源的培养基增菌效果为最佳, 其次为低聚异麦芽糖、低聚果糖、低聚半乳糖、水苏糖(图 1(a)). 不同浓度的不同益生元对增菌效果影响均极显著($P<0.01$), 当低聚木糖添加量为 0.4%, 0.6%和 0.8%, 低聚果糖添加量 0.2%, 0.4%和 0.6%, 低聚异麦芽糖添加量为 0.4%, 0.6%, 0.8%时,

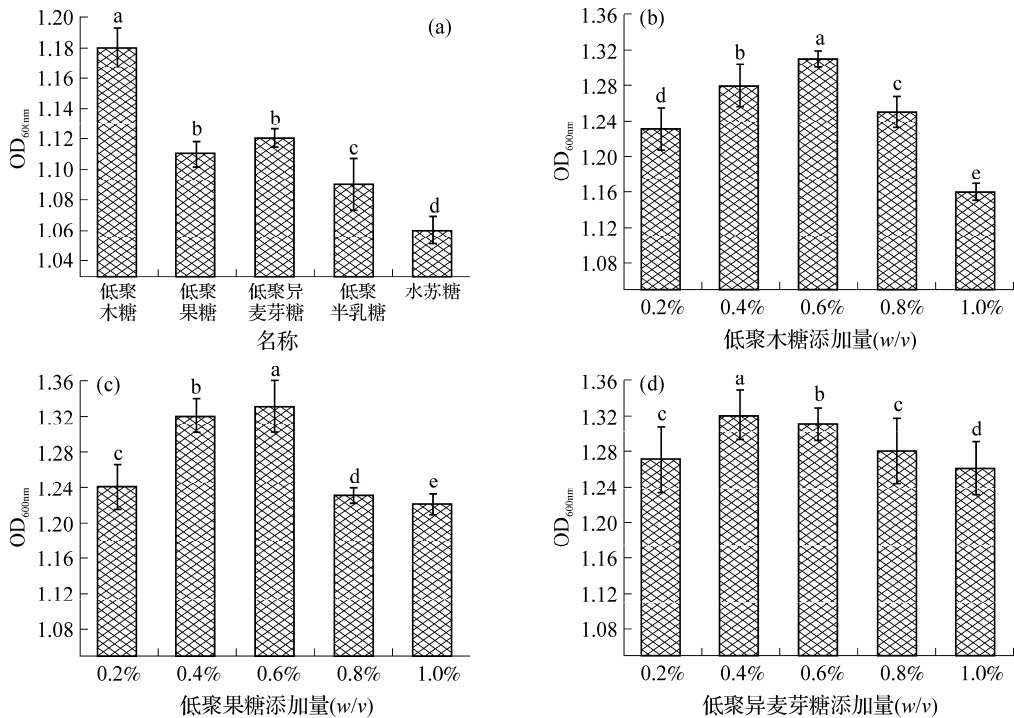
益生菌组合增菌效果较明显(图 1(b)~(d)). 低聚异麦芽糖添加量为 0.2%, 0.8%时, 增菌效果差异不显著. 当低聚异麦芽糖添加量为 0.8%时, 其 OD_{600nm} 值要略高于添加量为 0.2%处的 OD_{600nm} 值(图 1(d)). 故选用 0.4%, 0.6%和 0.8%的低聚木糖, 0.2%, 0.4%和 0.6%的低聚果糖, 0.2%, 0.4%和 0.6%的低聚异麦芽糖进行正交试验, 来确定益生元组合最佳浓度.

低聚木糖、低聚果糖、低聚异麦芽糖对益生菌的增殖影响随低聚糖的添加量呈抛物线趋势, 均在添加量 0.6%时, 菌液 OD_{600nm} 值达到最大, 增菌效果最佳. 其原因可能是高浓度的低聚糖在培养基中形成了高渗透压, 对益生菌产生一定的脱水作用而抑制了其生长; 而浓度过低对益生菌增殖促进作用不明显^[15].

表 2 不同益生菌组合发酵酸奶结果比较

试验号	比例(v/v) ¹⁾	感官评分 ²⁾	pH 值	感官评价
1	1/3	33.10	6.15	甜中带酸, 质地均匀, 无明显沉淀, 色泽乳白, 酸奶香味不够纯正
2	1/2	33.50	5.93	甜中带酸, 质地较均匀, 无明显沉淀, 色泽乳白, 有酸奶香味
3	1/1	36.70	5.87	甜中带酸, 质地均匀, 无明显沉淀, 色泽乳白, 酸奶香味浓郁
4	2/1	34.30	5.84	甜中带酸, 质地均匀, 无明显沉淀, 色泽乳白, 酸奶香味较浓郁
5	3/1	34.60	6.30	较淡, 质地均匀, 无明显沉淀, 色泽为乳白色, 有酸奶香味

注: 1) 干酪乳杆菌 S1 与乳酸乳球菌 LB12 的比例; 2) 总分为 40 分.



图中 a、b、c、d、e 表示不同处理之间差异的显著性, $P<0.01$

图 1 益生元种类及配比对增菌效果的影响

2.2.2 益生元浓度的确定

选用低聚木糖(A)、低聚果糖(B)和低聚异麦芽糖(C)各自对益生菌组合增菌效果最佳的3种浓度按表3进行正交试验。结果表明,对益生菌组合增菌效果的影响因素依次为:低聚果糖>低聚木糖>低聚异麦芽糖($B>A>C$);最佳益生元组合方案为添加0.8%低聚木糖、0.6%低聚果糖、0.8%低聚异麦芽糖($A_3B_3C_3$)。

表3 益生元组合正交试验设计及结果分析

试验号	A/%	B/%	C/%	OD _{600nm}
1	0.4	0.2	0.4	1.261
2	0.4	0.4	0.6	1.338
3	0.4	0.6	0.8	1.375
4	0.6	0.2	0.6	1.319
5	0.6	0.4	0.8	1.337
6	0.6	0.6	0.4	1.372
7	0.8	0.2	0.8	1.343
8	0.8	0.4	0.4	1.364
9	0.8	0.6	0.6	1.349
K1	3.974	3.923	3.997	-
K2	4.028	4.039	4.006	-
K3	4.056	4.096	4.055	-
R	0.082	0.173	0.058	-

2.3 合生元酸奶发酵条件优化

由表4可知,对合生元酸奶感官评定结果的影响因素依次为发酵时间>发酵温度>菌种总接种量($E>D>F$);当合生元酸奶发酵条件为发酵温度37℃,发酵时间10h,菌种总接种量为3%时,发酵得到的酸奶感官品质最好,口感好($D_2E_3F_2$)。

2.4 合生元酸奶高活性验证

将原料乳在发酵温度为37℃,菌种总接种量为3%的条件下发酵10h。测得在该条件下发酵完成的合生元酸奶活菌数为 9.26×10^9 cfu·mL⁻¹,而普通市售伊利酸奶活菌数为 6.06×10^8 cfu·mL⁻¹,为市售伊利酸奶15倍。由此可知,在该工艺条件下发酵得到的合生元酸奶具有高活性。

3 结论

采用多种具有良好增菌效果的益生元复合发酵具有潜在降胆固醇、产胞外多糖功能的益生菌,获得合生元酸奶最佳工艺条件:低聚木糖、低聚果

表4 发酵条件正交试验及结果分析

试验号	D/℃	E/h	F/%	感官评分
1	36	6	2	35.70
2	36	8	3	36.70
3	36	10	4	37.10
4	37	6	3	36.10
5	37	8	4	36.60
6	37	10	2	37.60
7	38	6	4	35.90
8	38	8	2	36.40
9	38	10	3	37.30
K1	109.50	107.70	109.70	-
K2	110.30	109.70	110.10	-
K3	109.60	112.00	109.60	-
R	0.80	4.30	0.50	-

糖、低聚异麦芽糖添加量分别为0.8%、0.6%、0.8%(w/v),干酪乳杆菌S1与乳酸乳球菌LB12比为1:1(v/v),总接种量3%,37℃下恒温发酵10h。制得合生元酸奶活菌数为 9.26×10^9 cfu·mL⁻¹,为市售伊利原味酸奶活菌数 6.06×10^8 cfu·mL⁻¹的15倍,也显著高于使用单一合生元发酵常规酸奶发酵菌种活菌数。如王利红等^[16]利用水苏糖做单一益生元生产合生元酸奶,活菌数量为 6.82×10^8 cfu·mL⁻¹;谢巍等^[17]以低聚异麦芽糖代替部分蔗糖,以嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌为发酵剂制作的冷冻酸奶,活菌数为 1.57×10^8 cfu·mL⁻¹;王晓晴等^[18]添加了5%低聚果糖和5%水苏糖,制备活菌数为 1.41×10^7 cfu·mL⁻¹发酵酸奶;曹吉利等^[19]添加8%的低聚木糖发酵酸奶,最大活菌总数为 7.14×10^8 cfu·mL⁻¹。目前关于合生元酸奶研究大多使用一种益生元,所用菌种也为常规发酵菌种,而利用复合益生元发酵功能性乳酸菌制备合生元酸奶的报道较少。益生元能增加发酵酸奶中益生菌的数量,同时还能促进人体肠道中有益菌增殖,对健康大有裨益,增加了酸奶的营养价值和保健功效。本文研究结果可为合生元发酵乳制品开发提供技术支持,在后续研究中,合生元酸奶的发酵过程将结合中试、大试等工业化生产工艺,如通过加入CaCl₂来稳定乳体系、改善乳清析出^[20]等。与普通酸奶相比,新型合生元酸奶在营养、保健、食疗等方面均优于普通酸奶,其产品也将拥有更大的市场。

参考文献:

- [1] FULLER R. Probiotics in man and animals: A review[J]. Applied Bacteriology, 1989, 66(5):365-378.
- [2] ALSHERAJI S H, ISMAIL A, MANAP M Y, et al. Prebiotics as functional foods: A review[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(4):1542-1553.
- [3] 张杰, 郝宏波, 苏贺靖, 等. 干酪乳杆菌发酵酸乳生产工艺优化[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(7):88-91.
- [4] 魏艳, 曾小群, 潘道东, 等. 新疆地区不同酸奶中优势乳酸菌的分离与鉴定[J]. 中国食品学报, 2012, 12(12): 161-166.
- [5] KAUR I P, CHOPRA K, SAINI A. Probiotics: Potential pharmaceutical applications[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002, 15(11):1-9.
- [6] PAN D D, ZHANG D Z. Function and safety assessment of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LB12 as potential probiotic strain[J]. African Journal of Biotechnology, 2008, 7(22):4037-4044.
- [7] 赵春枫, 曾小群, 潘道东, 等. 新型高效降胆固醇酸奶的研制[J]. 中国食品学报, 2012, 12(8):53-59.
- [8] 潘道东, 吴玲. 高产胞外多糖(EPS)乳酸菌菌株的筛选与鉴定[J]. 食品科学, 2007, 28(3):171-174.
- [9] PAN D, MEI X. Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 12 [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3):908-914.
- [10] CARVALHO A F A, NETO P D O, SILVA D F D, et al. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis[J]. Food Research International, 2013, 51(1):75-85.
- [11] DELGADO G T C, JUNIOR M R M, MORENO Y M F, et al. The putative effects of prebiotics as immunomodulatory agents[J]. Food Research International, 2011, 44(10):3167-3173.
- [12] 张丽萍, 杨晨, 王成强, 等. 干酪乳杆菌在酸奶生产中的应用研究[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(2):23-26.
- [13] 刘慧, 杜薇, 张红星. 乳酸乳球菌乳酸亚种高产胆盐水解酶发酵条件的优化研究[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 322-326.
- [14] 宋春花. 3M 测纸片检测原料乳菌落总数的比较试验[J]. 中国食品工业, 2004, 11(11):60-61.
- [15] 魏艳, 曾小群, 潘道东, 等. 水苏糖对植物乳杆菌的增菌效果研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(12):103-108.
- [16] 王利红, 陈合, 周喜幸, 等. 水苏糖对酸乳增菌效果的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(7):177-179.
- [17] 谢巍, 何伟. 含异麦芽低聚糖的冷冻酸奶研制[J]. 食品科学, 1999(3):31-33.
- [18] 王晓晴, 王榆元, 周春宏, 等. 添加小球藻和几种低聚糖对益生菌增殖和酸奶品质的影响[J]. 食品科学, 2012(7):158-162.
- [19] 曹吉利, 谭源, 舒国伟, 等. 低聚木糖对酸奶菌株生长及产酸的影响[J]. 食品工业, 2011(8):19-21.
- [20] 郝涤非, 张慧霞. 酸奶的质量控制与延长货架期的研究[J]. 中国酿造, 2009, 28(7):138-141.

Research on Preparing New Synbiotic Yogurt

PENG Liu-yang, ZENG Xiao-qun^{*}, PAN Qing, WANG Gang, HE Ya-ting,

PAN Dao-dong, LU Yin, CHEN Qun-yuan

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: To prepare a new synbiotic yogurt, the effects of different prebiotics, the additive amount of prebiotics, the ratio of probiotic strains, inoculation quantity, fermentation time and fermentation temperature are investigated in this work to evaluate the number of viable bacteria and the quality of yogurt. The optimal fermentation condition can be listed as follows: by adding 0.8% (w/v) xylooligosaccharide (XOS), 0.6% (w/v) fructooligosaccharide (FOS), 0.8% (w/v) isomaltoligosaccharide (IMO) (w/v), the ratio of liquid culture *Lactobacillus casei* S1 (*L. casei* S1) to *Lactococcus lactis* LB12 (*L. lactis* LB12) as 1:1(v/v), the inoculation quantity as 3% (v/v), fermenting at 37 °C for 10 h. The yogurt prepared under this fermentation condition is considered as good in several aspects such as taste, texture, color and flavor. The number of viable bacteria in the synbiotic yogurt is 9.26×10^9 cfu·mL⁻¹ which is about 15 times of Yili plain yogurt. The synbiotic yogurt is believed to have good market prospect for its potential functions for lowering cholesterol and antioxidation.

Key words: prebiotics; probiotics; number of viable bacteria; processing technology; synbiotic yogurt

(责任编辑 章践立)